

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年5月31日 (31.05.2001)

PCT

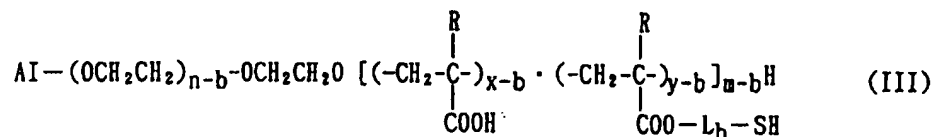
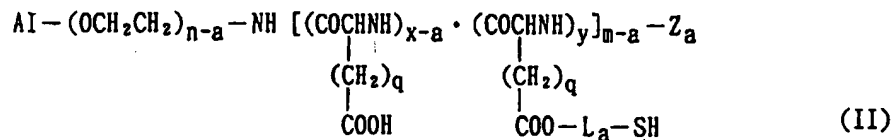
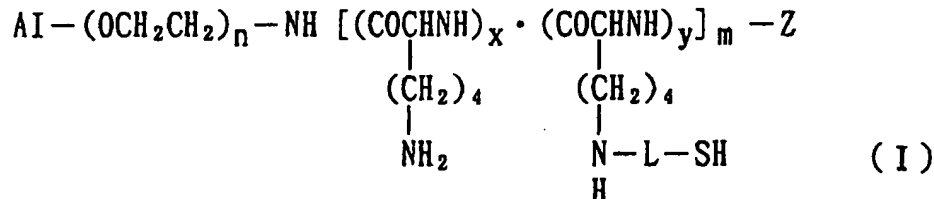
(10) 国際公開番号
WO 01/37879 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 47/34, C08J 3/02, C08G 69/40, B01J 13/00 // A61K 48/00, C12N 15/88
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06761
- (22) 国際出願日: 2000年9月29日 (29.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平 11/330065
1999年11月19日 (19.11.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): ナノキャリア株式会社 (NANOCARRIER CO., LTD.) [JP/JP]; 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉5丁目4番地6 Chiba (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 片岡一則 (KATAOKA, Kazunori) [JP/JP]; 〒165-0031 東京都中野区上鷺宮5-17-22 Tokyo (JP). 柿澤資訓 (KAKIZAWA, Yoshinori) [JP/JP]; 〒123-0865 東京都足立区新田3-32-10 諏訪ハイツ400号室 Tokyo (JP). 原田敦史 (HARADA, Atsushi) [JP/JP]; 〒276-0042 千葉県八千代市ゆりのき台4-5-6 プラザシティ3-1403 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 弁理士 小田島平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.); 〒107-0052 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): CA, CN, KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: POLYION COMPLEX MICELLES OF CORE/SHELL STRUCTURE

(54) 発明の名称: コアシェル構造のポリイオンコンプレックスミセル



(57) Abstract: A method of stabilizing polyion complex micelles of a core/shell structure comprising a polyelectrolyte and a block copolymer comprising a hydrophilic segment and a chargeable segment. The stabilization method is accomplished by fixing at least one thiol residue to the core-forming chargeable segment of each of block copolymer molecules to thereby form, between these chargeable segments, stable disulfide bond crosslinks through the thiol residues fixed thereto. Representative examples of the copolymer capable of being prepared by the stabilization method include ones represented by general formulae (I), (II), and (III). Thus, a method for stabilizing polyion complex micelles utilizable as a carrier for polyelectrolytes can be provided.

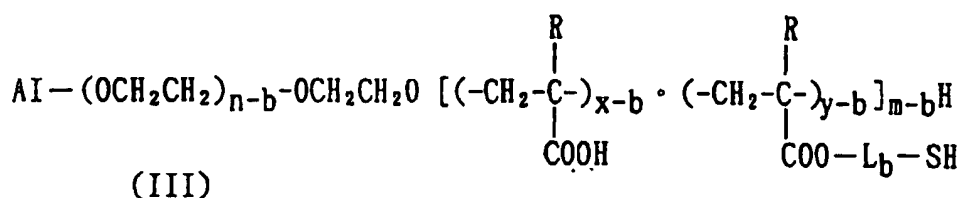
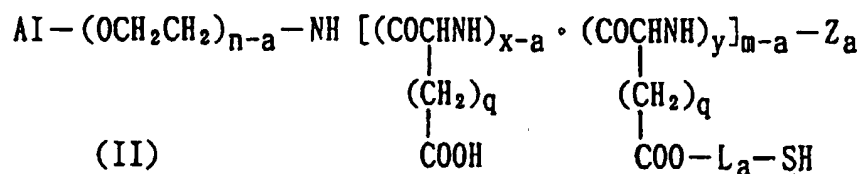
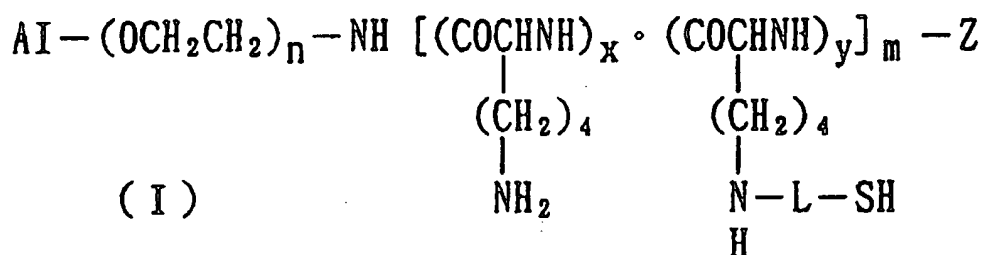
[続葉有]



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

親水性セグメントおよび荷電性セグメントとを含むブロック共重合体と高分子電解質とから形成されるコア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法が開示される。かかる安定化方法は、コア部を形成するブロック共重合体荷電性セグメントに少なくとも1個のチオール残基を担持させ、該荷電性セグメント間でそれらに担持させたチオール残基を介するジスルフィド結合の架橋安定を形成させることにより達成される。かような安定化方法によって調製することのできる共重合体の代表的なものは一般式 (I)、(II)、(III) で表すことができる。こうして、高分子電解質の運搬体として利用できるポリイオンコンプレックスミセルの安定化法が提供できる。



明 細 書

コア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセル

技術分野

本発明は、コア-シェル構造を持つポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法および安定化された該ミセル、ならびに該ミセルの調製に使用できる特定のブロック共重合体に関する。該コア-シェル構造は、そのコア部がブロック共重合体の荷電性セグメントと高分子電解質のポリイオンコンプレックスからなり、そしてシェル部がブロック共重合体の親水性セグメントからなる。

10 背景技術

カチオン性のブロック共重合体であるポリ（エチレングリコール）-ブロック-ポリ（L-リシン）【以下、PEG-P(Lys)という場合あり】と、天然もしくは合成アニオン性単独重合体は、両者の間に働く静電的相互作用によって水中で自律的に会合し、球形のミセルを形成する。このミセルは粒径が数十ナノメートルで、内核のポリイオンコンプレックスをPEG外殻が覆ったコア-シェル構造を持っており、ポリイオンコンプレックスミセル（PICミセル）と呼ばれている（Harada and Kataoka, *Macromolecules*, 1995, 28, 5294-5299; Kataoka et al., *Macromolecules*, 1996, 29, 8556-8557; Harada et al., *Macromolecules*, 1998, 31, 288-294; Kabanov et al., *Macromolecules*, 1996, 29, 6797-6802）。

これらのPICミセルは、PEG鎖の外核に覆われた内核に種々のアニオン性高分子を保持することができる上、数十ナノメートルという粒

径とコア-シェル構造により生体の異物認識機構を回避することが期待できる。したがって、例えばアンチセンスDNAや遺伝子治療のためのプラスミドDNAの運搬体として利用することが考えられている。一般的にこれらのPICミセルは、生理的条件下で相当安定であるが、実際の使用に際しては、静脈注射による投与後の希釈によってPICミセルが解離してしまうことや、血清タンパク質と相互作用することや、生理条件下での安定性が十分でない場合も存在する。このため、確実に目的部位へ到達するまで解離せず安定に存在するように、PICミセルの性質を改変する必要がある。PICミセルを安定化する目的で、共有結合による内核（コア）や外殻（シェル）を架橋することが提案されている（Guo et al., *Macromolecules*, 1996, 29, 2487-2493; Thurmond et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 7239-7240）。しかし、期待する薬効を得るためには、目的の細胞内の環境に応答して架橋が開裂し、PICミセルが解離することにより、内包されたDNAを放出しなければならない。

発明の開示

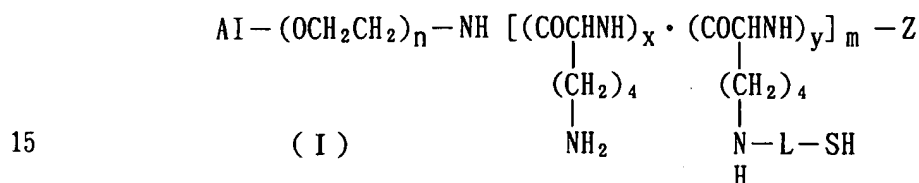
したがって、本発明の目的は、殊に、PICミセルが少なくとも動物の細胞内に送達されるまでは安定であるが、細胞内ではPICミセルが容易に解離されるようなPICミセルの安定化手段を提供するにある。

本発明者らは、従来の共有結合による架橋に代え、ジスルフィド（-SS-）結合を介する架橋を利用すると、細胞外では安定に保持できるが、細胞内ではPICミセルが容易に解離しうることを見出した。理論により拘束されるものでないが、このような作用・効果は、動物細胞の内部が、一般的に、血流中と比較してより強い還元的環境であることか

ら（例えば、Huang et al., Bioconjugate Chem. 1998, 9, 612-617 参照）、ジスルフィド結合が細胞内ではチオールに還元され開裂することに起因するものと考えられる。

したがって、本発明は、親水性セグメントおよび荷電性セグメントを含むブロック共重合体と高分子電解質とから形成されるコア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法であって、コア部を形成するブロック共重合体の荷電性セグメントに少なくとも1個のチオール残基を担持させ、該荷電性セグメント間でそれらに担持させたチオール残基を介するジスルフィド結合の架橋を形成させることを特徴とする前記安定化方法、に関する。

また本発明は、かような安定化方法によって調製することのできる、例えば、一般式（I）



式中、A I は水素原子またはアニオン重合開始剤の有機残基を示し、

Z は水素原子または式-L-SHの残基を示し、

L はC₁₋₂₀アルキレン、C₁₋₆アルキル-フェニル、C₁₋₆アルキル-フェニレン-C₁₋₆アルキル、フェニレンおよびカルボニル-C₁₋₂₀アルキルからなる群より選ばれる連結基を示し、

n は5～20,000、（好ましくは50～20,000）の整数であり、

m は5～10,000の整数であり、そして

x の単位と y の単位の割合は 20 : 1 ~ 1 : 2 である、
で表されるブロック共重合体と高分子電解質とから形成されたコア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセルであって、水性媒質中でコア部を形成する該ブロック共重合体のポリアミンセグメント（式（I）で
5 m の繰り返し単位を持つセグメント）と高分子電解質とがイオン対を形成しており、そして該セグメント内の少なくとも 1 個メルカプトを介して該共重合体の 2 分子以上が架橋していることを特徴とするポリイオン
コンプレックスミセル組成物に関する。

他方、別の態様の共重合体を用いる本発明は、上記一般式（I）のポリ
10 リアミンセグメントがポリカルボン酸（例えば、ポリ（アスパラギン酸）もしくはポリ（グルタミン酸）またはポリ（メタクリル酸）もしくはポリ（アクリル酸））、並びにそれらの一部がチオール化されたポリカル
ボン酸セグメントにより置き替えられた共重合体を用いるポリイオン
コンプレックスミセルの安定化方法、該イオンコンプレックスミセル組成
15 物に関する。

またさらに、本発明は、上記一般式（I）で表されるブロック共重合体にも関する。

図面の簡単な説明

図 1 は、製造例 1 で得られたチオール残基の導入された PEG-P(L
20 y s) の ^1H -NMR スペクトラムである。

図 2 は、製造例 2 で調製されたチオール化した PEG-P(L y s) と P(A s p) から形成させたポリイオンコンプレックスミセルの z-
平均粒径分布を示すグラフである。透析 3 日後、測定角度 90° ; 温度
25 $^\circ\text{C}$; ブロック共重合体濃度 2 mg/ml ; 溶媒 10 mM PBS (p

H 7.4) の条件に従う。

図 3 は、架橋ミセル（黒丸）および架橋をしていないミセル（白抜き丸）の NaCl 濃度に対する見かけの分子量の変化を示すグラフである。

ブロック共重合体濃度 1 mg/ml ; 濃度 25 °C ; 溶媒 10 mM PBS

5 S (pH 7.4) の条件に従う。

図 4 は、本発明に従う PIC ミセル溶液ヘジチオスレイトール (DTT) を添加した後の散乱光強度の変化を示すグラフである。DTT 添加

濃度 : 0.5 mM (丸)、1.0 mM (四角)、2.0 mM (三角) ; ブ

ロック共重合体濃度 1.0 mg/ml ; NaCl 濃度 0.3 M ; 濃度 25

10 °C ; 溶媒 10 mM PBS (pH 7.4) の条件に従う。

図 5 は、製造例 3 で得られた DNA 内包架橋ミセルのキャピラリー電気泳動測定による DNA の酵素耐性試験の結果を示すエレクトログラム

である。(A) は酵素処理前の 20 mer DNA の溶液、ならびに (B)

はフリー DNA 酵素処理 1 時間後、(C) は架橋無しミセル酵素処理 1

15 時間後、および (D) は架橋ミセル酵素処理 1 時間後の処理液による。

図 6 は、GSH による架橋ミセルの解離によるアンチセンス DNA の放出試験の結果を示すグラフである。(10) は、リシン残基の 10 %

をチオール化した PEG-P (Lys) を用いて調製した架橋ミセル、

(21) は 21 % のもの、および (26) は 26 % のものを用いた場合

20 の放出された DNA の相対的な量を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明のコアーシェル構造のポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法は、上述のようなジスルフィド結合を介してミセルが安定化されるものである限り、使用するブロック共重合体および高分子電解質は、

それらの種類に制限されることなくすべて本発明に包含される。かようなブロック共重合体は、それ自体既知の親水性セグメントと荷電性セグメントからなる共重合体に、必要により、適当な化学的手段でチオール残基を共有結合させたものが使用できる。親水性セグメントは、主として、ポリ（エチレングリコール）からなるものが好ましい。「主として」
とは、ポリ（エチレングリコール）が、分子量比で、セグメント中の80%以上を占めるものであればよい。他方、荷電性セグメントは、いずれかのpH、好ましくは、pH 3.0～8.5の水性媒質（または水溶液）
中で、カチオンまたはアニオンのいずれかに荷電しうる基を繰り返し単位中に少なくとも1個含むセグメントを意味する。カチオンに荷電しうる基としては、アミノ基またはイミノ基、さらには第四級アミノ基を挙げることができる。これらの基は、高分子側鎖に存在するか、さらにイミノ基もしくは第四級アミノ基にあっては高分子主鎖に存在していてもよい。アニオンに荷電しうる基としてはカルボキシル基もしくはスルホ基
または硫酸基を挙げることができる。これらの基は、それらの基を高分子側鎖とする繰り返し単位を有するそれ自体既知の重合体を利用して、あるいはそのような重合体の製造方法を利用して、ブロック共重合体中に組み込むことができる。

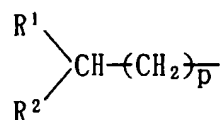
本発明に従えば、これらの荷電性セグメント（ ω -末端を含む）には少なくとも1個のチオール残基が担持されていることが必要である。ここでチオール残基とは、チオール化合物に由来する残基を意味し、これらの残基は例えば、上記アミノまたはイミノ基へ保護されていてもよいメルカプト基含有アルキル化剤またはアシル化剤を用い、あるいはカルボキシル基の場合には、カルボキシル基に保護されていてもよいメルカ

プト基含有アミンまたはアルコールを用い、常法により導入することができる。

限定されるものでないが、親水性セグメントがポリ（エチレングリコール）であり、荷電性セグメントの荷電しうる基がアミノ基またはイミノ基であるブロック共重合体としては、上記、Kataoka（片岡）et al. 5
に記載された PEG-P(Lys) や、Kabanov et al., Bioconj. Chem. 1995, 6, 639 に記載されたポリ（エチレングリコール）-ポリスぺルミン共重合体や、また、本願と同時に係属する特願平 11-221026 号明細書に記載されるオキサゾリン由来のポリアミン単位を
10 有するブロック共重合体が挙げられる。これらの共重合体の荷電性セグメントへのチオール残基の導入は、例えば、詳細には後述する、活性エステル型の N-スクシンイミジル 3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネートやこれらの類似物を用いて、アミノ基またはイミノ基をアシル化し、次いで、ピリジルチオ基を還元開裂することにより実施することが
15 できる。

したがって、本発明の好ましい態様としては、上記一般式（I）で表されるブロック共重合体を用いる安定化された PIC ミセルが提供される。一般式（I）で表されるブロック共重合体はそれ自体新規化合物である。

20 一般式（I）で表されるブロック共重合体における AI を規定するアニオン重合開始剤に有する有機残基は具体的には、式



(上記式中、

(i) p は 0 ~ 10 の整数であって、かつ R^1 および R^2 は、独立して、水素原子、 C_{1-10} アルコキシ、アリアルオキシもしくはアリアル- C_{1-3} アルキルオキシ基を示すか、または、

- 5 R^1 および R^2 は、一緒になって、 C_{1-8} アルキルで置換されていてもよいエチレンジオキシ ($-O-CH(R')-CH-O-$: ここで R' は水素原子または C_{1-8} アルキルである) もしくはオキシ ($=O$) 基を示すか、または

- (ii) p は 0 または 1 であって、かつ R^1 および R^2 は、一緒になって単糖もしくはその誘導体の残基を構成する原子団を示す、
10 の基である。

このような

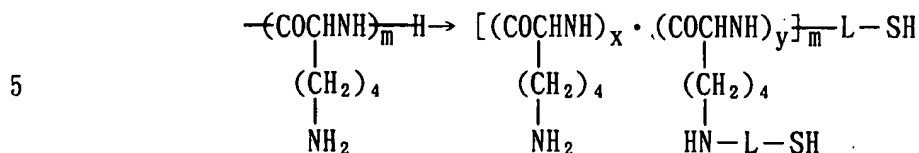


- 15 セグメントを形成する方法は、例えば、上述の Kataoka et al., や、WO 96/32434、WO 96/33233、WO 97/06202 等に具体的に記載されている。これらの記載は、引用することによって本明細書に組み込まれる。また、かような親水性セグメントに、荷電性セグメント、例えば、



を導入する方法は上述の Kataoka et al. や、そこで引用されている文献に詳細に記載されている方法に従えばよい。

本発明によれば、荷電性セグメントにチオール残基が例えば下記反応スキームに従って、ブロック共重合体のポリアミンセグメント中に共有結合的に導入される。



(上式中、LはC₁₋₂₀アルキレン、C₁₋₆アルキルフェニル、C₁₋₆アルキルフェニレン-C₁₋₆アルキル、フェニレンおよびカルボニル-C₁₋₂₀アルキルからなる群より選ばれる連結基であり、好ましくはカルボニル-C₂₋₆アルキルであり、そして

10

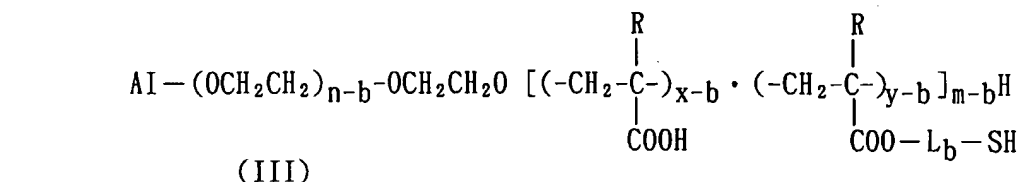
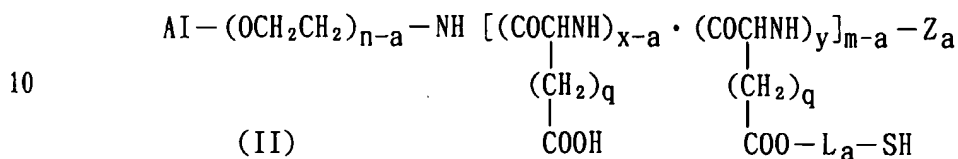
xの単位対yの単位の最適な割合は、m値によっても変動しうるので限定されないが、通常、20:1~1:2の範囲内にある。また、xの単位とyの単位は、それぞれブロックを形成してもよいが、好ましくはランダムに配列される。)

15 上記の反応スキームは、それ自体既知の反応、例えば、対応するモノハロゲン化チオールを用いるアルキル化、対応する活性エステルを用いるアシル化によって実施できる。

こうして、製造された、チオール残基を担持するブロック共重合体は新規化合物であり、本発明の一態様である。

20 他方、親水性セグメントがポリ(エチレングリコール)であり、荷電性セグメントの荷電しうる基がカルボキシル基であるブロック共重合体としては、ポリ(エチレングリコール)にポリ(β-ベンジルアスパラギン酸またはγ-ベンジルグルタミン酸)を付加して得られる共重合体(例えば、EP 0 583 955 B1参照)を、部分加水分解してベ

ンジル基を脱離させた後に、チオール残基を導入するか、またはベンジ
 ル基を保護されたメルカプト基含有アルコールでエステル交換すること
 によって、得ることができる。また、リビングカチオン重合により得ら
 れたポリ（エチレングリコール）に、さらにメタクリル酸もしくはアク
 5 リル酸を重合させることにより得られるブロック共重合体（例えば、W
 O 97/06202参照）のポリ（カルボン酸）セグメントにチオー
 ル残基を導入してもよい。こうして得られる共重合体の代表的なものは、
 次の一般式（II）および（III）で表すことができる。



上式中、各AIは、式（I）について定義したとおりであり、

Z_aは水素原子または式-L_a-SHもしくは-COOL_a-SHの
 残基を示し、

L_aおよびL_bは、それぞれ独立して、C₁₋₂₀アルキレン、C₁₋₆ア
 20 ルキルフェニル、C₁₋₆アルキルフェニレン-C₁₋₆アルキル、また
 はフェニレンを示し、

Rは水素原子もしくはメチル基を示し、

n-aおよびn-bは、それぞれ独立して、5~20,000の整数
 であり、

$m - a$ および $m - b$ は、それぞれ独立して、 $5 \sim 10,000$ の整数であり、

q は整数 1 または 2 であり、そして

$x - a$ の単位対 $y - a$ の単位、および $x - b$ の単位対 $y - b$ の単位は、

5 それぞれ独立して、 $20 : 1 \sim 1 : 2$ である。

本発明に従う P I C ミセルの調製は、上記 Harada and Kataoka や Kataoka et al., に記載のそれ自体既知の方法により、親水性セグメントおよび荷電性セグメントとを含み、さらに電荷性セグメント中に少なくとも 1 個のチオール残基を担持させたブロック共重合体と高分子電解質とを水性媒質中で処理することにより行うことができる。処理法の具体例については、後述の実施例で説明するので参照することができる。

本発明の P I C ミセル中に内包される高分子電解質は、荷電性セグメントに応じてそれぞれ選ぶことができるが、一般的に、水性媒質（または水）中でイオン解離する基を有するポリマーを意味する。しかし、本
15 明細書では、所謂、オリゴマーと称される範疇に入るものも「ポリ」の接頭辞を付していることに注意されたい。したがって、高分子電解質として、ポリペプチド、オリゴペプチド、プソイドペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチドを挙げることができ、これらの直鎖状または環状であってもよい。ペプチド類には、それ自体既知の各種生理活性
20 ペプチド、生理活性プソイドペプチド、などが包含され、ポリヌクレオチドには、DNA断片、RNA断片、アンチセンスDNA、環状DNA、などが包含される。これらのペプチド類またはポリヌクレオチド類は、通常、pHによって、カチオンまたはアニオンに荷電しうる場合があるので、P I C ミセル調製条件を選ぶことにより、荷電性基がカチオンを

生じるかまたはアニオンを生じるかのいずれのブロック共重合体と共に使用することもできる。しかし、ポリヌクレオチド類を用いる場合には、カチオンを生じるブロック共重合体、特に、一般式（I）で表されるブロック共重合体を用いてPICミセルを調製することが好ましい。

- 5 本発明に従えば、PICミセルが形成された後、ブロック共重合体の荷電性セグメントに担持させたチオール残基を介するジスルフィド結合による架橋が形成されることに特徴がある。かようなジスルフィド結合は、PICミセル含有水性媒質を酸化条件下に置くことにより形成できる。通常、酸化条件は周囲環境下への放置ないしは空気酸化される条件下に置くのがよい。本発明に関していう水性媒質とは、一般に、水、適
- 10 当な緩衝剤また、場合によって電解質、さらには水混和性の有機溶媒をも含む水溶液を意味する。

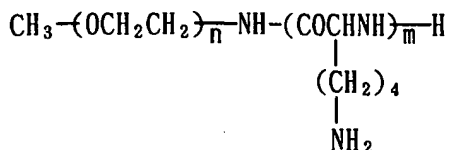
- 本発明に従う安定化されたPICミセルは電解質がかなり含まれる水性媒質中でも安定に存在することができるが、還元条件下の、特に一定
- 15 濃度の電解質を含む水性媒質中では解離しうる。

したがって本発明によれば、特に高分子電解質を生体内に運搬または送達するために適する手段が提供できる。

- 以下、具体例を挙げて本発明をさらに説明するが、これらは本発明の理解を容易にするために、ポリ（アミン）セグメントが、ポリ（リシン）
- 20 セグメントである共重合体の例を挙げるが、本発明をこれらに限定することを意図するものではない。

製造例1：チオール残基が導入されたPEG-P(Lys)の製造

（1）PEG-P(Lys)の製造

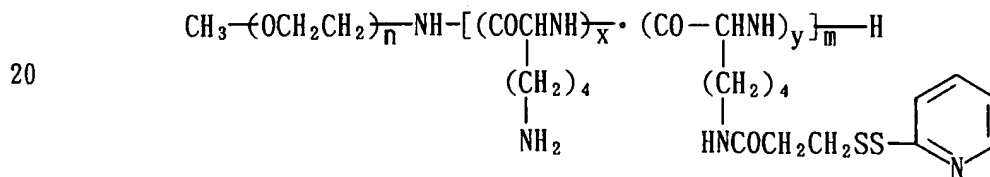


上述の Kataoka et al. に記載の方法に従って得られた α -メトキシ
 5 - ω -アミノポリ（エチレングリコール）（PEG、Mw=5000）
 を開始剤として用い、 ϵ -ベンジルオキシカルボニル-L-リシンのN
 -カルボン酸無水物（NCA）を開環重合することによってポリ（エチ
 レングリコール）-ブロッカーポリ（ ϵ -ベンジルオキシカルボニル-L
 -リシン）（PEG-P(Lys(Z))）を製造した。こうして得ら
 10 れたPEG-P(Lys(Z))のベンジルオキシカルボニル基（Z基）
 を30% HBr / AcOHで脱保護してPEG-P(Lys)を得た。

他方、高分子電解質のモデル化合物としてのポリ（L-アスパラギン
 酸）（P(Asp)）は、 β -ベンジル-L-アスパルテートのNCA
 の開環重合により重合したポリ（ β -ベンジル-L-アスパルテート）
 15 （開始剤n-ブチルアミン）をアルカリ脱保護して得た。

PEG-P(Lys)のポリリシンセグメントおよびP(Asp)の重
 合度は、 $^1\text{H-NMR}$ 測定から、それぞれ22と15と求められた。

(2) PEG-P(Lys)へのチオール残基の導入



PEG-P(Lys)へのピリジルジチオプロピオニル基PDP基)
 の導入を行った。この導入は、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジ

ルジチオ) プロピオネート (SPDP) を用いて行った。PEG-P(Lys) は臭素酸塩のものを 0.1 N、pH 6.5 の酢酸緩衝液に溶解させ、同緩衝液に対して透析し、対イオンを酢酸イオンに交換して用いた。PEG-P(Lys) 酢酸塩 (200 mg) と SPDP (56 mg、リジン残基に対して 0.5 モル当量) を 5 ml の N-メチルピロリドン (NMP、5 wt % の塩化リチウムを添加し脱気したもの) に溶解させた。この溶液に 0.5 ml の N,N-ジイソプロピルエチルアミンを、アミンを脱プロトン化するために添加し、反応を開始した。反応液は、室温で 1 時間攪拌し、反応の追跡は逆相クロマトグラフィーによって行った。

10 反応の終了後、反応液を PEG の貧溶媒であるエーテルに滴下し再沈した。粗生成物をメタノールに溶解させた後、エーテルに再沈する操作を繰り返し、水に不要な不純物を取り除いた。過剰の塩は、生成物を 0.1 N の酢酸水溶液に溶解させ、蒸留水に対して 1 時間透析することによって取り除いた。最終精製物は、凍結乾燥し回収した。収量は 150 mg であった (ポリマーのモル数から計算した収量は 69 %)。

15

得られたポリマーの構造は $^1\text{H-NMR}$ 測定によって確認した (スペクトラムは図 1 参照)。PDP 基の置換度は、 $^1\text{H-NMR}$ 測定と UV 測定によって決定した。 $^1\text{H-NMR}$ 測定では D_2O を溶媒として用い、PDP 基のピリジル基のプロトン ($\text{C}_3\text{H}_4\text{N}$: 7.6 ppm) と PEG のメチレン基のプロトン (OCH_2CH_2 : 3.5 ppm) のピークの強度比から、置換度は 6.8 と求められた。UV 測定では、PDP 基をジチオスレイトール (DTT) によって還元したときに遊離する 2-チオピリドンの吸光度 ($\lambda_{\text{max}} = 343 \text{ nm}$, $\epsilon = 7.06 \times 10^3$) から、置換度 6.7 と計算された。異なる二つの方法で求められた置換度は良

20

く一致しており、リジンのアミノ基の約30%にPDP基が導入されたことが示された。

製造例2：ジスルフィド(SS)結合で内核を架橋したPICミセルの調製

- 5 内核をSS結合で架橋したPICミセルの調製は以下の方法で行った。
- まず、上記の方法でPDP基を導入したPEG-P(Lys) (PEG-P(Lys)-PDP)を、10mMリン酸緩衝液(pH7.4)に溶解させた後、0.1- μ mのフィルターで濾過しゴミを除いた。次に、
- 10 DTTをPDP基に対して3倍の濃度となるように加えて15分間攪拌し、PDP基をチオール残基に還元した。この溶液にP(Asp)をPEG-P(Lys)-PDPの正電荷とP(Asp)の負電荷の比が1となるように添加しPICミセルを形成させた。ここで、PEG-P(Lys)-PDPのアミノ基とP(Asp)のカルボキシル基は、PEG-P(Lys)とP(Asp)の測定結果に基づいて、全てイオン化して
- 15 いると仮定した。

- 両ポリマーを混合し、2時間静置したあと、分画分子量6000-8000の透析膜を用いて、1Lの10mMリン酸緩衝液(pH7.4)に対して透析し、DTTや2-チオピリドンを除いた。透析は3日間続け、この間、空気中の酸素によって、チオールをSS結合に酸化し架橋
- 20 させた。3日間の透析後、未酸化のチオールが存在しないことは、Ellman法によって確認した。PICミセルの溶液は、透明で沈殿は認められなかった。

特性試験：光散乱法による架橋ミセルの特性解析

架橋したPICミセルの構造は、動的光散乱測定法(DLS)によっ

て評価した。ミセル溶液に対してDLS測定を行い、ヒストグラム法によってデータを解析して得られた結果から、架橋したPICミセルの粒径の分布は単峰性であり、分布の程度もかなり小さいことが示された
($dw/dn = 1.10$) (図2参照)。拡散係数の測定角度依存性は
5 なく、ミセルが球形であることも示唆された。また、測定の範囲内(高分子濃度 $0.5 - 4.0 \text{ mg/ml}$) で拡散係数の濃度依存性はなく、二次的な凝集は認められなかった。無限希釈に外挿しもとめた拡散係数の値から、Stokes-Einstein の式を用いて、ミセルの流体力学的半径は 16.1 nm と計算された。キュムラント法によって求められた多分散度
10 は 0.08 であり、天然のウィルスにも匹敵する値となった。

また、透析前、チオールをSS結合に酸化する前のミセルの粒径は 15.7 nm であった。透析前後PICミセルの粒径がほぼ同程度であるという結果は、SS結合の形成がミセルの構造に大きな影響を与えていないということを示唆している。少なくとも2週間、PICミセルの粒径に目立った変化はなかった。これは、PICミセルの内核が親水性のPEG層によって覆われており、それらの立体反発のため、コロイド粒子としての高い安定性を持っているためであると考えられる。
15

SS架橋のPICミセルの安定性に対する影響は、種々のNaCl濃度に対するミセルの見かけの分子量を静的光散乱法によって測定し評価した(図3参照)。チオールを導入しておらず架橋されていないPICミセルの場合は、NaCl濃度の増加とともに見かけの分子量は急激に減少する挙動がみられ、ミセルが解離した。一方、架橋ミセルの見かけの分子量の減少は、NaCl濃度 0.5 M においても非常に小さかった。また、DLSから求めたキュムラント粒径は、評価したNaClの濃度
20

の範囲内で32.0 nmから35.2 nmであり、ミセルがNaCl濃度に対して著しく安定化していることが確認できた。

5 PICミセルの安定化が、SS結合の架橋の形成によるものであることを確認するために、還元剤を添加し散乱光強度の変化を追った(図4参照)。安定化がSS結合のために起こっているならば、高塩濃度下で、SS結合を選択的に開裂させる還元試薬であるDTTを添加するとPICミセルの解離が起こるはずである。実際に、DTT添加後の測定角度90°の散乱光強度を追跡した結果、散乱光強度の急激な減少が見られた。この減少は、ミセルの解離に対応していると考えられ、安定化がSS結合の形成によることが確認された。また、解離速度はDTTの添加濃度依存性であり、2 mMでは、50分程度でミセルは完全に解離した。また、このPICミセルの解離と同調して、内包されたP(Asp)は、溶液中に放出されることが考えられる。

15 動物細胞中に最も大量に存在するSS結合の還元剤は、グルタチオンという低分子チオールであり、その濃度は細胞内では3 mM程度であるのに対し、血流中では、その300分の1の10 μ Mのオーダーであることが知られている。このように、細胞内と細胞外で濃度が大きく異なり、SS結合の解離速度は還元剤の濃度に依存することから、SS結合で安定化したPICミセルを、DNAを含む生理活性をもつ高分子電解質、例えばポリアニオンの、細胞内への運搬体として利用することが可能であると考えられる。

製造例3：アンチセンスDNAを内包した架橋PICミセルの調製

製造例1に準じて製造したPEG-P(Lys)をのリシン側鎖に、製造例2に準じて、PDP基を導入し、PEG-P(Lys)12-3

9 (PEGの分子量12,000、リシンの重合度39、PDPの導入率：リシン残基に対して約26%)を得た。このPDP基導入PEG-P(Lys)12-39を25mM Tris-HCl (pH7.4)緩衝液に溶解させた後、還元剤ジチオトレイトール(DTT)溶液を添加し、PDPをチオール残基へと変換した。この溶液とアンチセンスDNA(20mer)溶液(緩衝液：25mM Tris-HCl (pH7.4))をPEG-P(Lys)とDNAの電荷の比が1:1となるように混合しミセルを形成させた。溶液を3時間以上静置した後、25mM Tris-HCl (pH7.4)および10mM PBS (pH7.4, 37℃)に対して透析し、還元剤などの不純物を取り除くとともに空気中の酸素によってミセルの内核を酸化架橋した。

製造例3で得られたDNA内包架橋ミセルの特性試験：

1) キャピラリー電気泳動測定によるアンチセンスDNAの分解酵素耐性の評価

15 実験方法：

試料としては上記架橋ミセルと、PEG-P(Lys)12-39とアンチセンスDNA(20mer)から調製した架橋していないミセルおよびフリーの状態のアンチセンスDNAを使用した。それぞれの溶液(DNA濃度、 $196\mu\text{g}/\text{ml}$) $110\mu\text{l}$ に分解酵素溶液(酵素ホスホジエステラーゼI：0.02unit) $110\mu\text{l}$ を添加し、37℃で反応させた。1時間後、95℃で5分間加熱し酵素を失活させ反応を停止した。ミセル溶液には、デキストラン硫酸、DTT、内標25mer DNA溶液 $50\mu\text{l}$ を加え測定に供した。

キャピラリー電気泳動測定の条件は以下の通りである。

測定装置 : BioFocus 3000 (BioRad)

キャピラリー : coated capillary (75 μ m ID \times 24 cm)

印可電圧 : 12 kV

5 泳動液 : オリゴヌクレオチド用高粘性液 (BioRad社製)

サンプル注入 : 10 kV, 3 sec

検出 : 26 nm

実験結果 :

図5が、酵素処理前の20merアンチセンスDNAと内標25mer DNAのエレクトロフェログラム、フリーのDNAを酵素処理したもの、架橋していないミセルを酵素処理したもの、アンチセンスDNA内包架橋ミセルを酵素処理したものである。フリーのアンチセンスDNAでは1時間後に20merのピークはほぼ消失しているのに対し、ミセルに内包されたものは分解が抑制されている。架橋無しのミセルと架橋ミセルの反応1時間後のエレクトロフェログラムを比較すると、架橋した15 ものでは分解物がほとんどみられず、架橋によってDNAの分解酵素に対する耐性が更に向上していることが確認される。

2) 細胞内還元剤グルタチオン (GSH) による架橋ミセルの解離

実験方法 :

20 架橋ミセルとしては、リシン残基に対して10, 21, 26%のチオール基を導入したPEG-P(Lys)を用いて調製したものを使用した。架橋ミセルの調製方法は上述の通りである。それぞれのミセル溶液(DNA濃度、294 μ g/ml) 20 μ lに、DNAと当量のポリビニル硫酸を添加したGSH溶液(GSH濃度、0M, 20mM, 200mM,

2 mM) 25 μ l を添加し、25 $^{\circ}$ C で 2.4 時間静置した。放出されたアンチセンス DNA は、12.5% のポリアクリルアミド電気泳動で分離、定量した。DNA の染色は、エチジウムブロマイドでおこなった。電気泳動は、印可電圧 300 V、泳動時間 30 分で行った。放出された DNA のバンドの定量は画像解析装置にて行った。

実験結果：

図 6 は、電気泳動によって得られたフリー DNA のバンドを画像処理装置によって定量し、GSH 濃度 1 mM の状態で放出された DNA の量を 1 として、棒グラフとして表したものである。10, 21, 26% のチオール基を導入した PEG-P (Lys) を用いて調製した架橋ミセルそれぞれにおいて、GSH 濃度 1 mM と比較して、100 μ M, 10 μ M の場合は DNA 放出量が少なく、GSH の濃度依存的にミセルが解離し、内包された DNA が放出されることが示された。細胞内の GSH の濃度は数 mM、血流中では 10 μ M であることが知られているため、以上の結果は、SS 結合による内核架橋ミセルが細胞内において選択的に解離することを示唆するものである。

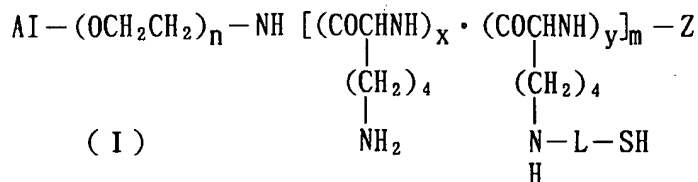
産業上の利用可能性

本発明に従う、SS 結合による内核架橋ミセルは、細胞内等の還元性環境下において選択的に解離しうる。したがって、例えば、かような環境に薬物を特異的に送達するのに有用である。よって、本発明は製剤業等で利用できる。

請 求 の 範 囲

1. 親水性セグメントおよび荷電性セグメントを含むブロック共重合体と高分子電解質とから形成されるコア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセルの安定化方法であって、コア部を形成するブロック共重合体荷電性セグメントに少なくとも1個のチオール残基を担持させ、該荷電性セグメント間で、それらに担持させたチオール残基を介するジスルフィド結合の架橋を形成させることを特徴とする前記安定化方法。
2. ブロック共重合体の親水性セグメントがポリ（エチレングリコール）を含んでなり、そして荷電性セグメントがポリアミンまたはポリカルボン酸を含んでなり、かつ高分子電解質がポリペプチド、ポリプソイドペプチドおよびポリヌクレオチドからなる群より選ばれる請求項1記載の安定化方法。
3. 親水性セグメントがポリ（エチレングリコール）含んでなり、そして荷電性セグメントがポリアミンを含んでなる請求項1記載の安定化方法。
4. 親水性セグメントがポリ（エチレングリコール）含んでなり、そして荷電性セグメントがポリカルボン酸を含んでなる請求項1記載の安定化方法。

5. ブロック共重合体が一般式（I）：



上式中、A I は水素原子またはアニオン重合開始剤の有機残基を示し、

Zは水素原子または式 $-L-SH$ の残基を示し、

Lは C_{1-20} アルキレン、 C_{1-6} アルキルフェニル、 C_{1-6} アルキルフェニレン- C_{1-6} アルキル、フェニレンおよびカルボニル- C_{1-20} アルキルからなる群より選ばれる連結基を示し、

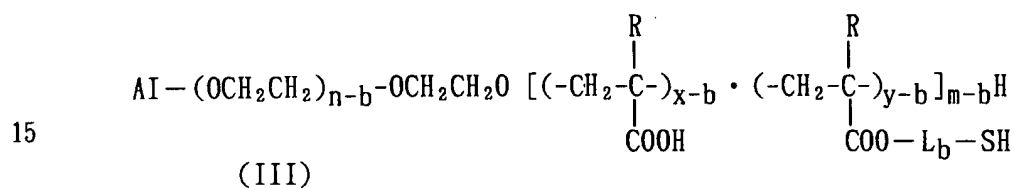
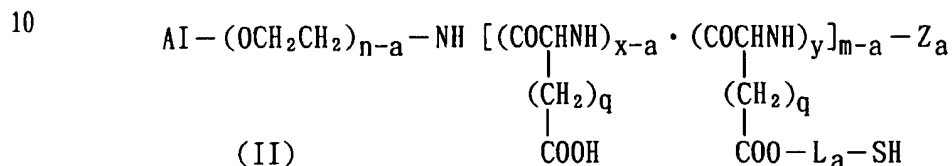
5 n は5~20,000の整数であり、

m は5~10,000の整数であり、そして

x の単位対 y の単位の割合は20:1~1:2である、

で表される請求項1記載の安定化方法。

6. ブロック共重合体が一般式(II)または(III):



上式中、各AIは、式(I)について定義したとおりであり、

Z_a は水素原子または式 $-L_a-SH$ もしくは $-COL_a-SH$ の残基を示し、

20 L_a および L_b は、それぞれ独立して、 C_{1-20} アルキレン、 C_{1-6} アルキルフェニル、 C_{1-6} アルキルフェニレン- C_{1-6} アルキル、またはフェニレンを示し、

R は水素原子もしくはメチル基を示し、

$n-a$ および $n-b$ は、それぞれ独立して、5~20,000の整数

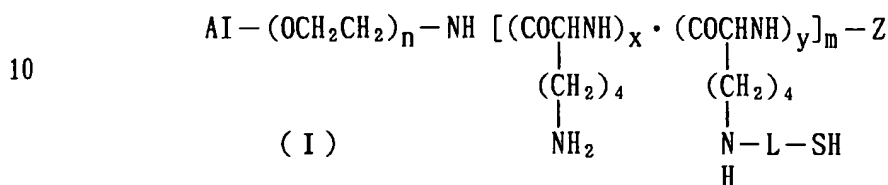
であり、

$m - a$ および $m - b$ は、それぞれ独立して、 $5 \sim 10,000$ の整数であり、

q は整数 1 または 2 であり、そして

- 5 $x - a$ の単位対 $y - a$ の単位、および $x - b$ の単位対 $y - b$ の単位は、それぞれ独立して、 $20 : 1 \sim 1 : 2$ である、
で表される請求項 1 記載の安定化方法。

7. 一般式 (I) :



式中、A I は水素原子またはアニオン重合開始剤の有機残基を示し、

Z は水素原子または式 $-\text{L}-\text{SH}$ の残基を示し、

- 15 L は C_{1-20} アルキレン、 C_{1-6} アルキルフェニル、 C_{1-6} アルキルフェニレン、 C_{1-6} アルキル、フェニレンおよびカルボニル- C_{1-20} アルキルからなる群より選ばれる連結基を示し、

n は $5 \sim 20,000$ の整数であり、

m は $5 \sim 10,000$ の整数であり、そして

- 20 x の単位と y の単位の割合は $20 : 1 \sim 1 : 2$ である、

で表されるブロック共重合体と高分子電解質とから形成されたコア-シェル構造のポリイオンコンプレックスミセルであって、水性媒質中でコア部を形成する該ブロック共重合体のポリアミンセグメント (式 (I) で m の繰り返し単位を持つセグメント) と高分子電解質とがイオン対を形

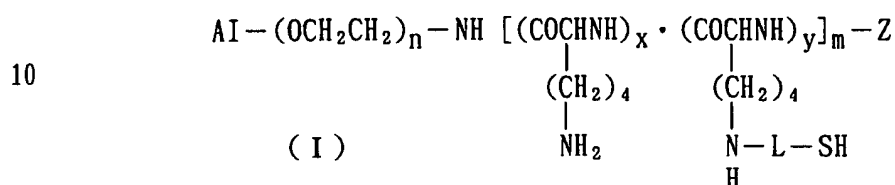
成しており、そして該セグメント内の少なくとも 1 個のチオール残基を介して該共重合体が架橋していることを特徴とするポリイオンコンプレックスミセル組成物。

8. 高分子電解質がオリゴーまたはポリヌクレオチドである請求項7

5 記載の組成物。

9. 高分子電解質がアニオン荷電性のオリゴーまたはポリペプチドである請求項7記載の組成物。

10. 一般式 (I) :



式中、A Iは水素原子またはアニオン重合開始剤の有機残基を示し、
Zは水素原子または式-L-SHの残基を示し、

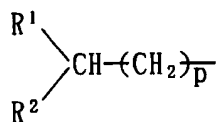
15 LはC₁₋₂₀アルキレン、C₁₋₆アルキルフェニル、C₁₋₆アルキルフェニレン-C₁₋₆アルキル、フェニレンおよびカルボニル-C₁₋₂₀アルキルからなる群より選ばれる連結基を示し、

n は $5 \sim 20,000$ の整数であり、

mは5～10,000の整数であり、そして

20 x の単位と y の単位の割合は $20 : 1 \sim 1 : 2$ である、
で表されるブロック共重合体。

11. 一般式 (I) における A I が水素原子あるいは式



(上記式中、

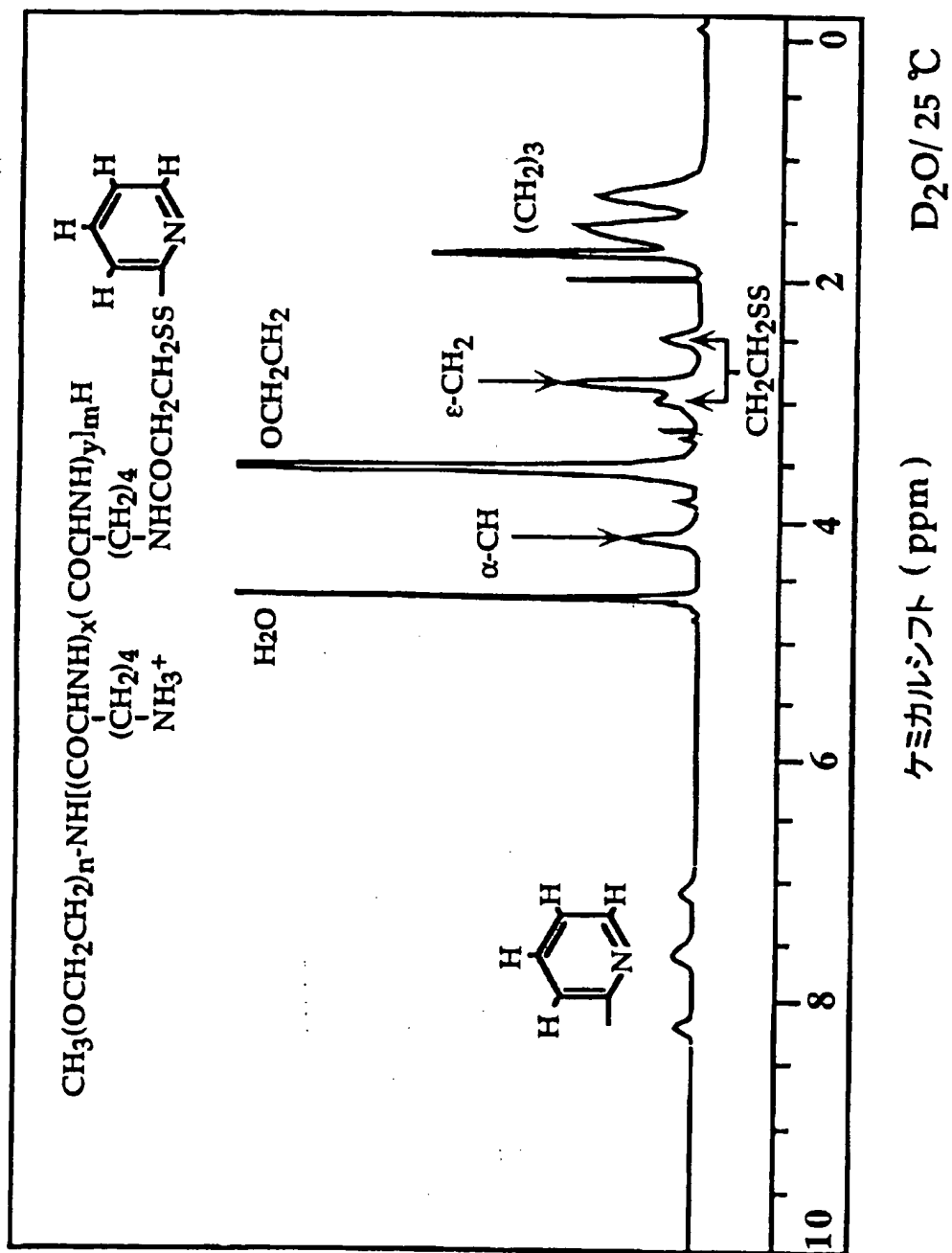
- (i) p は 0 ～ 10 の整数であって、かつ R^1 および R^2 は、独立して、水素原子、 C_{1-10} アルコキシ、アリールオキシもしくはアリールー
- 5 C_{1-3} アルキルオキシ基を示すか、または、
- R^1 および R^2 は、一緒になって、 C_{1-6} アルキルで置換されていてもよいエチレンジオキシ ($-O-CH(R')-CH-O-$: ここで R' は水素原子または C_{1-6} アルキルである) もしくはオキシ ($=O$) 基を示すか、または
- 10 (ii) p は 0 または 1 であって、かつ R^1 および R^2 は、一緒になって単糖もしくはその誘導体の残基を構成する原子団を示す、
- の基である請求項 8 記載の共重合体。

12. 一般式 (I) における L がカルボニル- C_{2-6} アルキルである請求項 10 または 11 記載の共重合体。

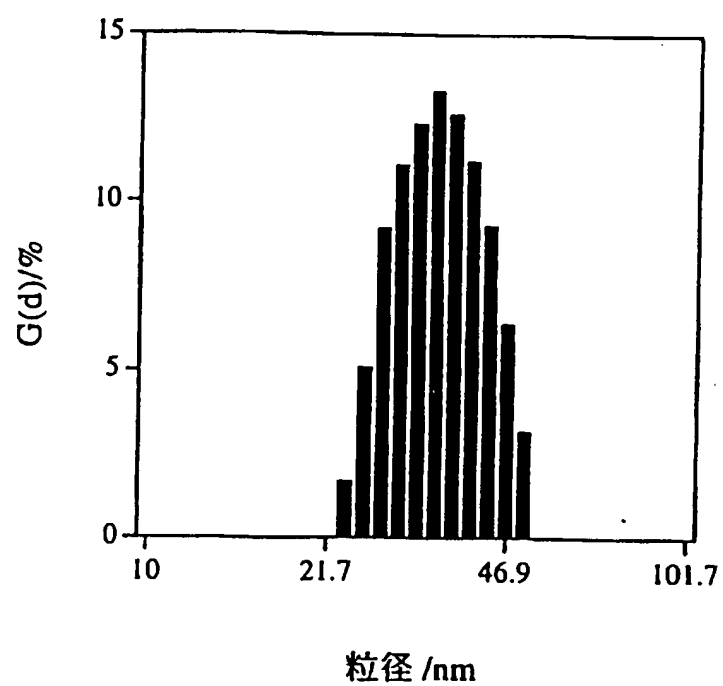
15

20

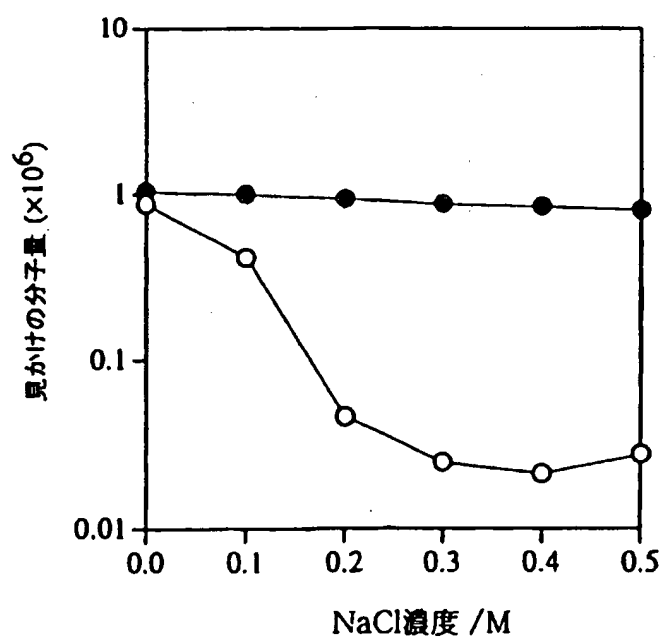
【図 1】



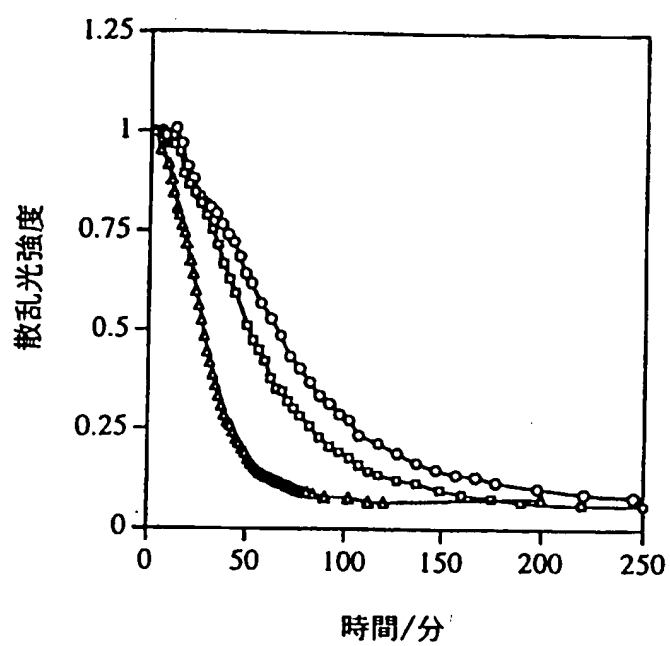
【図 2】



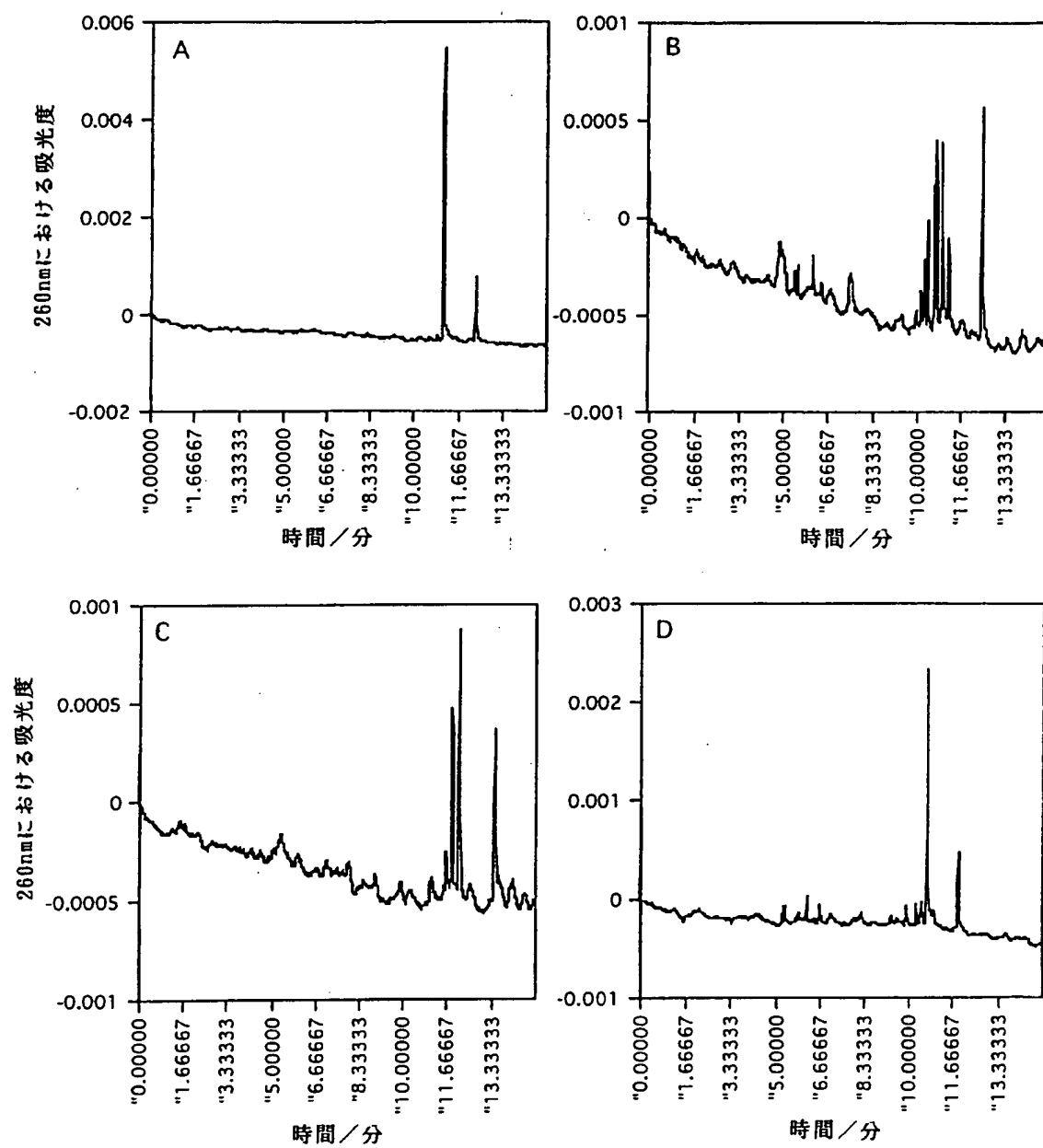
【図 3】



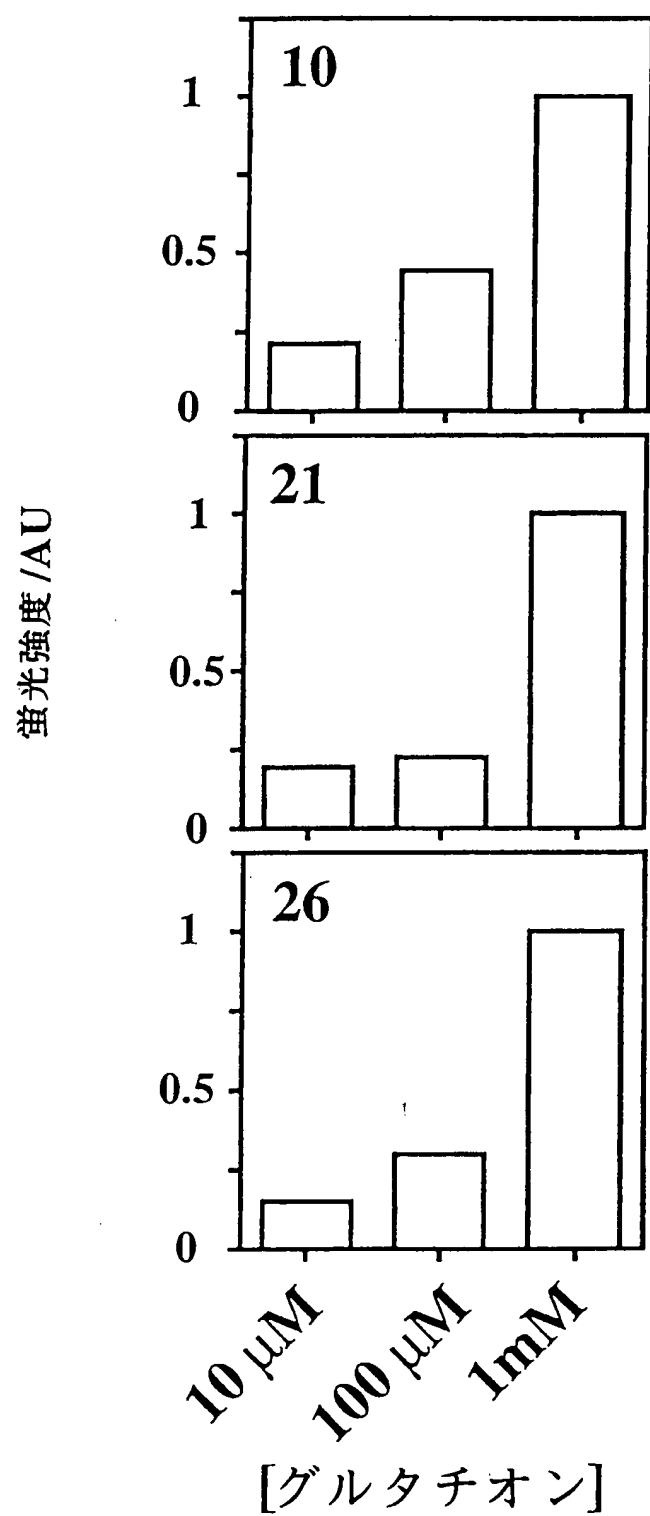
【図 4】



【図 5】



【図 6】



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K47/34, C08J3/02, C08G69/40, B01J13/00//
A61K48/00, C12N15/88

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K47/34, C08J3/02, C08G69/40, B01J13/00//
A61K48/00, C12N15/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN), MEDILINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), JICST (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	KAKIZAWA, Y et al., "Environment-Sensitive Stabilization of Core-Shell Structured Polyion Complex Micelle by Reversible Cross-Linking of the Core through Disulfide Bond," J. Am. Chem. Soc. December 1999, Vol.121. No.48, pp.11247-11248, Full text	1-12
X Y	Y. KAKIZAWA et al., "Antisense DNA Naihou Polyion Complex Micelles no Kouchiku; SS-Ketsugou ni yoru Naikaku Anteika Kouka," Koubunshi Gakkai Yokoushuu, September 1999, Vo.48, pp.2989-2990, Full text	1-5, 7-12 6
Y	HARADA, Atsushi et al., "Novel Polyon Complex Micelles Entrapping Enzyme Molecules in the Core: Preparation of Narrowly-Distributed Micelles from Lysozyme and Poly(ethylene glycol)-Poly(aspartic acid) Block Copolymer in Aqueous Medium.," Macromolecules, 1998, Vol.31, No.2, pp.288-294, Full text	6
Y	EP, 844269, A1 (KATAOKA Kazunori), 27 May, 1998 (27.05.98), Claims & WO, 97/06202, A1 & CA, 2229068, AA	6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 December, 2000 (06.12.00)

Date of mailing of the international search report
19 December, 2000 (19.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06761

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& AU, 9666310, A1 & CN, 1192759, A & BR, 9610053, A & NO, 9705584, A & US, 5929177, A	
A	HARADA, Atsushi et al., "Formation of Polyion Complex Micelles in an Aqueous Milieu from a Pair of Oppositely-Charged Block Copolymers with Poly (ethylene glycol) Segments," Macromolecules, 1995, Vol.28, No.15, pp.5294-9	1-5,7-12
A	KATAOKA Kazunori et al., "Spontaneous Formation of Polyion Complex Micelles with Narrow Distribution from Antisense Oligonucleotide and Cationic Block Copolymer in Physiological Saline," Macromolecules, 1996, Vol.29, No.26, pp.8556-8557	1-5,7-12
A	KABANOV Alexander et al., "Soluble Stoichiometric Complexes from Poly(n-acetyl-4-vinylpyridinium) Cations and Poly(ethyleneoxide)-block-polymethacrylate Anions," Macromolecules, 1996, Vol.29, No.21, pp.6797-6082	1-5,7-12
A	JP, 6-206832, A (Nippon Kayaku Co., Ltd.), 26 July, 1994 (26.07.94), abstract; Claims (Family: none)	1-5,7-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06761

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claims 1-6 pertain to a method for stabilizing general polyion complex micelles, while claims 7-11 pertain to a specific copolymer and a polyion complex micelle composition containing the copolymer. The technical feature of the former is the stabilization of general polyion complex micelles including a wide variety of micelles having no relation to the specific copolymer which is the technical feature of the latter. The technical features of the two neither are the same nor correspond to each other. Therefore, claims 1-6 and claims 7-11 are not considered to be a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K47/34, C08J3/02, C08G69/40, B01J13/00//
A61K48/00, C12N15/88

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K47/34, C08J3/02, C08G69/40, B01J13/00//
A61K48/00, C12N15/88

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN),
JICST (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	KAKIZAWA, Y et al. "Environment-Sensitive Stabilization of Core-Shell Structured Polyion Complex Micelle by Reversible Cross-Linking of the Core through Disulfide Bond.", J. Am. Chem. Soc. Dec. 1999, Vol. 121, No. 48, pp. 11247-11248 文献全体	1-12
X Y	柿澤資訓 等、「Antisense DNA内包ポリイオンコンプレックスミセルの構築—SS—結合による内核安定化効果—」、高分子学会予稿集、1999年9月、第48巻、第2989-2990ページ 文献全体	1-5, 7-12 6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.12.00

国際調査報告の発送日

19.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

瀬下 浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3752

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	HARADA, Atsushi et al, "Novel Polyion Complex Micelles Entrapping Enzyme Molecules in the Core: Preparation of Narrowly-Distributed Micelles from Lysozyme and Poly(ethylene glycol)-Poly(aspartic acid) Block Copolymer in Aqueous Medium.", Macromolecules, 1998, Vol.31, No.2, pp.288-294 文献全体	6
Y	EP, 844269, A1 (Kataoka, Kazunori) 27. 5月. 1998 (27. 05. 98) Claims &WO, 97/06202, A1&CA, 2229068, AA &AU, 9666310, A1&CN, 1192759, A &BR, 9610053, A&NO, 9705584, A &US, 5929177, A	6
A	HARADA, Atsushi et al, "Formation of Polyion Complex Micelles in an Aqueous Milieu from a Pair of Oppositely-Charged Block Copolymers with Poly(ethylene glycol) Segments.", Macromolecules, 1995, Vol.28, No.15, pp.5294-9	1-5, 7-12
A	KATAOKA, Kazunori et al, "Spontaneous Formation of Polyion Complex Micelles with Narrow Distribution from Antisense Oligonucleotide and Cationic Block Copolymer in Physiological Saline.", Macromolecules, 1996, Vol.29, No.26, pp.8556-8557	1-5, 7-12
A	KABANOV, Alexander et al, "Soluble Stoichiometric Complexes from Poly(n-acetyl-4-vinylpyridinium)Cations and Poly(ethyleneoxide)-block-polymethacrylate Anions.", Macromolecules, 1996, Vol.29, No.21, pp.6797-6802	1-5, 7-12
A	JP, 6-206832, A (日本化薬株式会社) 26. 7月. 1994 (26. 07. 94) 【要約】、【特許請求の範囲】 (ファミリーなし)	1-5, 7-12

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-6は、一般的なポリオンコンプレックスミセルの安定化方法に係るものであり、請求の範囲7-11は特定の共重合体及び該共重合体を含有するポリオンコンプレックスミセル組成物に関するものであり、前者の技術的特徴は後者の技術的特徴である特定の共重合体と関連のない広範なものも包含する一般的なポリオンコンプレックスミセルの安定化であるから、両者の技術的特徴は、互いに同一でもなく、対応するものでもないから、両者は単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明には当たらない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。